

青藏高原固沙草属种质资源收集和保存*

苏旭^{1,2}, 岳伟¹, 刘建全^{1**}

(1 兰州大学生命科学学院草地农业生态系统国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000; 2 青海师范大学生命与地理科学学院青藏高原环境与资源教育部重点实验室, 青海 西宁 810008)

摘要: 固沙草属 (*Orinus*) 是禾本科具有重要经济价值的高山特有属, 具有较强的抗逆特性, 是农业良种繁育、畜牧业牧草改良利用的重要资源。该属记载 6 个物种, 均分布在青藏高原。在过去 5 年内, 我们调查了该属所有物种在青藏高原的分布, 并收集了种子、DNA 材料和标本; 采用 ITS 序列对物种界限进行了探讨, 发现 6 个物种中只出现两个比较明显的遗传分支, 表明原有的一些物种在分类上应予以合并。我们进一步讨论了这些丰富的种质资源对将来研究和利用固沙草属的重要性和相关途径。

关键词: 青藏高原; 固沙草属; 种质资源; 物种划分

中图分类号: Q 948.5; Q 949

文献标识码: A

文章编号: 2095-0845(2013)03-343-05

Germplasm Collection and Preservation of *Orinus* (Poaceae) in the Qinghai-Tibet Plateau*

SU Xu^{1,2}, YUE Wei¹, LIU Jian-Quan^{1**}

(1 State Key Laboratory of Grassland Agro-Ecosystem, School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

2 Key Laboratory of Education Ministry of Environments and Resources in Tibetan Plateau, School of Geography and Life Science, Qinghai Normal University, Xining 810008, China)

Abstract: *Orinus* is an alpine genus with important values in the grass family (Poaceae). All six species recognized within this genus are distributed in the Qinghai-Tibet Plateau. In the past five years, we surveyed the distributions of each species in this region and collected germplasm resources, including seeds, DNA and specimens. We further used the ITS sequence variation to tentatively delimit the previously acknowledged species and found that there is no distinct boundary between species and only two distinct lineages were recognized for all six species, indicating that some species should not be treated as separate species. These data provide an important resource for further utilizing and studying this genus.

Key words: Qinghai-Tibet Plateau; *Orinus*; Germplasms; Species Delimitation

固沙草属 (*Orinus* Hitchcock) 隶属于禾本科 (Poaceae) 画眉草族 (Eragrostideae) 三齿稃亚族 (Tridentinae), 为多年生草本。该属植株具细长、多节且覆盖鳞片的根状茎, 秆直立、丛生, 叶狭窄、线形, 花序顶生、圆锥状, 小穗含 1~8 朵小花, 颖质薄、顶端尖, 外稃全部或仅

于下部及边缘具柔毛, 内稃近等长于外稃或稍长, 颖果先端具茸毛等为主要鉴别特征, 和三齿稃亚族中的其它属形成明显区别。该属小穗侧扁不明显、甚至呈圆筒形, 外稃 3~5 脉、背部无脊、先端通常具短芒, 与隐子草属 (*Cleistogenes* Keng) 和三齿稃属 (*Tridens* Beauv.) 等类群关

* 基金项目: 科技部科技基础性工作专项重点项目 (2007FY110100) 和国家自然科学基金项目 (31260052)

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: liujq@lzu.edu.cn

收稿日期: 2013-03-19, 2013-03-26 接受发表

作者简介: 苏旭 (1980-) 男, 博士, 在站博士后, 主要从事植物分类和分子系统学研究。E-mail: xusu8527972@126.com

系密切。蔡联炳等(2004)根据植物叶片下表皮特征曾指出,国产三齿稃亚族中固沙草属最原始,隐子草属可能直接起源于固沙草属,并在自身基础上派生出了较为高级的三齿稃属。

固沙草属目前记录有6种,主要分布于青藏高原及其邻近的高山地区,仅有少部分居群分布在邻近的稍低海拔地区,属于北温带植物区系成分。通常,该属植物喜生于海拔2 500~4 800 m的山坡、草地、林缘、路旁、河谷、湖岸等比较极端的环境下,是沙丘、草原植被的主要成分(杨锡麟,1990)。尤其是该属具有较强的耐旱、寒、碱以及抗病、抗风沙的能力,并且具有发达的根系,因而是保土固沙的重要植物。此外,该属营养价值较高,是畜牧业上的重要牧草;所有物种的花序相对粗长、穗多粒大,加之抗逆性强的优点,是将来农牧业上禾草良种繁育的重要资源植物。本文重点报道了我们在青藏高原调查该属各物种的具体分布、种质资源收集结果以及初步利用ITS序列进行的种间界定,为该属植物未来的研究和资源利用提供重要资料。

1 分类历史

固沙草属最初是依据产于克什米尔地区的 *O. arenicola* Hitchc. 种名建立的属名(Hitchcock, 1933)。20世纪50年代末,耿以礼(1959)、耿

伯介和刘亮(1960)以及 Tzvelev (1968) 对该属的研究新增了鸡爪草 (*O. anomala* Keng ex f. & L. Liou) 和青海固沙草 (*O. kokonorica* (Hao) Tzvel.) 两个种。Bor (1960) 的研究进一步证实早期发表的 *O. arenicola* Hitchc. 就是早年报道产于西藏的 *Diplachne thoroldii* Stapf ex Hemsl. 的异名,从而使固沙草属模式转为 *Orinus thoroldii* (Stapf ex Hemsl.) Bor (固沙草)。杨锡麟(1990)在《中国植物志》固沙草属下承认了3个种;赵南先和李名飞(1994)又发表西藏固沙草 (*Orinus tibeticus* N. X. Zhao)。蔡联炳(2004)报道了固沙草属两个种—固沙草和鸡爪草在青海分布的新记录,并对两种植物地理分布上过去的不完善认识进行了分析,编制了区分固沙草属4种植物的分类检索表。Chen等(2006)在《Flora of China》中也确认固沙草属有4种。随后,Zhang和Cai(2008),Su和Cai(2009)又报道了固沙草属的另两个新种—高秆固沙草 (*O. alticulus* L. B. Cai & T. L. Zhang) 和长颖固沙草 (*O. longiglumis* L. B. Cai & X. Su)。根据这些新发表物种的形态鉴别特征,本文重新整理和编制了分种检索表,对固沙草属的分类进行了一次系统总结。固沙草属记载的所有6个种全都分布在青藏高原地区,仅有部分种的分布延伸到毗邻地区。

固沙草属植物分种检索表 Key to the species of *Orinus*

- | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| 1. 圆锥花序扩展;外稃通常密被长柔毛,第一外稃长5.0~7.0 mm | 2 |
| 1. 圆锥花序紧缩;外稃疏被柔毛或短柔毛,第一外稃长4.0~5.5 mm | 5 |
| 2. 颖片长于或近等于相邻的小花;圆锥花序长8~23 cm | 长颖固沙草 <i>O. longiglumis</i> |
| 2. 颖片短于相邻的小花;圆锥花序通常长3~9 cm | 3 |
| 3. 内稃通常长于外稃;外稃疏被柔毛;叶片不具小刺毛 | 高秆固沙草 <i>O. alticulus</i> |
| 3. 内稃近等于外稃;外稃被长柔毛;叶片局部具小刺毛 | 4 |
| 4. 小穗长6.0~8.5 mm,通常含2~4小花;秆和叶片局部被毛 | 固沙草 <i>O. thoroldii</i> |
| 4. 小穗长8.0~11.0 mm,通常含5~8小花;秆和叶片全部被毛 | 西藏固沙草 <i>O. tibeticus</i> |
| 5. 小穗长6.5~8.5 mm,通常含2~4小花;外稃疏被柔毛 | 青海固沙草 <i>O. kokonorica</i> |
| 5. 小穗长5.0~6.0 mm,仅含1或2小花;外稃疏被短柔毛 | 鸡爪草 <i>O. anomala</i> |

2 物种分布和资源收集

根据现有文献和中国科学院西北高原生物研究所青藏高原生物标本馆(QTPMB)、中国科学院植物研究所标本馆(PE)及四川农业大学小麦研究所标本室(SAUT)保存的固沙草属腊叶

标本,确定了过去固沙草属标本的采集地,发现大都采自青藏高原;所有标本采集地是我们调查的重点;同时,也对高原面上其它地区是否有该属植物分布进行全面的调查;具体的调查范围约为N27°29'10.3"—N39°16'13.5",E79°48'09"—

E102°30'59.7", 海拔 2 218 ~ 5 183 m; 发现典型的固沙草属植物居群, 进行 GPS 定位、相关气候数据收集、固沙草属植物形态性状描述、标本采集和伴生物种的记录等; 2008 年始, 每年夏秋季进行野外调查, 采集固沙草属植物标本、DNA 样品以及成熟种子等。

通过详细调查, 我们发现 6 个物种中, 固沙草分布最广, 从西藏自治区的阿里地区一直分布到拉萨市一带; 西藏固沙草分布于西藏自治区的扎囊县、曲水县、定结县、定日县和康马县; 鸡爪草分布于青海省的共和县和囊谦县、西藏自治区的丁青县、甘肃省的夏河县; 青海固沙草分布于青海省的海晏县、共和县和囊谦县; 长颖固沙草仅分布于西藏自治区的普兰县和乃东县; 高秆固沙草仅分布于青海省的西宁市。我们发现长颖固沙草、高秆固沙草以及西藏固沙草的一些物种鉴别特征不是十分稳定, 情况也出现于固沙草和青海固沙草中。另外, 四川省西部、西藏自治区东部分布的固沙草属植物, 形态上介于固沙草、鸡爪草和西藏固沙草之间, 但也有自己独特的一些特征, 如: 根状茎不具鳞片, 颖片全部密被长柔毛等; 我们暂把这些居群材料分归于这三个物种之下。我们一共收集了 53 个野生自然居群 (图 1) 的种质资源材料, 包括 766 个体的 DNA

材料, 以及 31 个居群的种子。每个居群采集了不少于 5 个个体的材料作为标本。上述所有物种的标本、居群样品和成熟种子等均保存于中国西南野生生物种质资源库 (GBOWS) 中。

3 基于分子证据的物种初步界定

利用多个形态性状通过主成分分析获得形态群 (Phenetic group) 是种间界限划分的重要基础 (Rieserberg 等, 2006), 我们对固沙草属所有居群采集的标本进行类似的工作。最近两年来, DNA 条形码技术 (DNA barcoding) 成为物种鉴定最为有效的手段之一 (Li 等, 2011; China Plant BOL Group, 2011), 并且指出 ITS 比以前通常使用的叶绿体 DNA 片段 (如 *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*) 在物种鉴定能力方面更为有效。我们利用 nrDNA ITS 序列对固沙草属植物 6 个物种部分居群进行了相关研究。每种从所采样品具有标准形态的 3 个居群中选择 9 个个体, 利用 China Plant BOL Group (2011) 推荐的标准方法进行 ITS 片段的扩增和测序。

以 *Leptochloa viscida* (Scribn.) Beal 和 *Eragrostis parviflora* (R. Br.) Trin. 为外类群, 采用启发式搜索和贝叶斯推论法建立所有个体之间的系统关系树, 并检验它们之间的遗传差异。如图 2 所示,

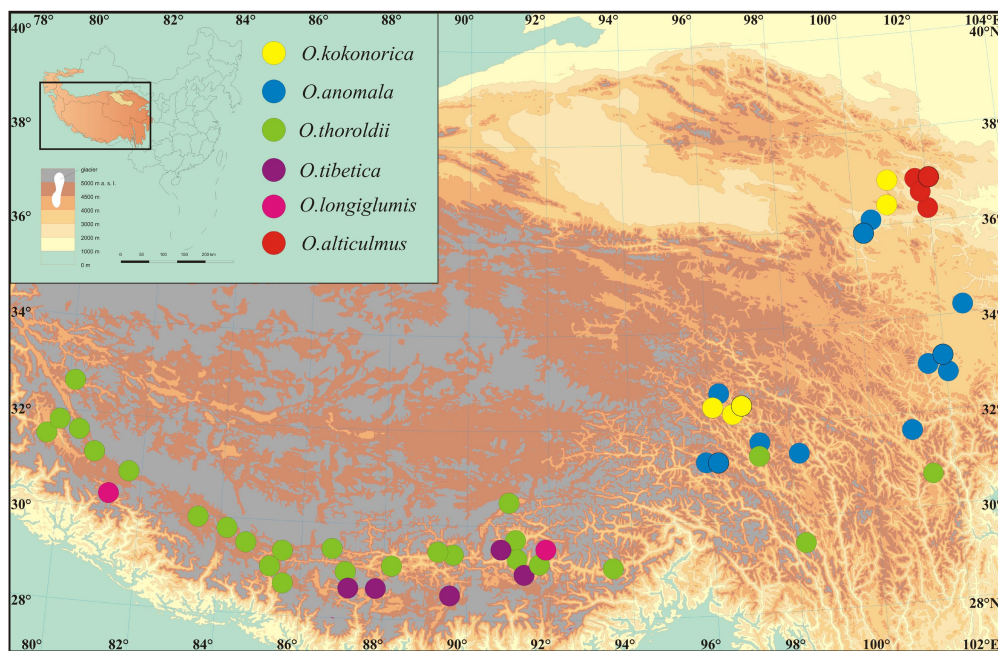


图 1 固沙草属植物种质资源采集地理分布图

Fig. 1 Sampling localities of *Orinus* surveyed in the Qinghai-Tibetan Plateau

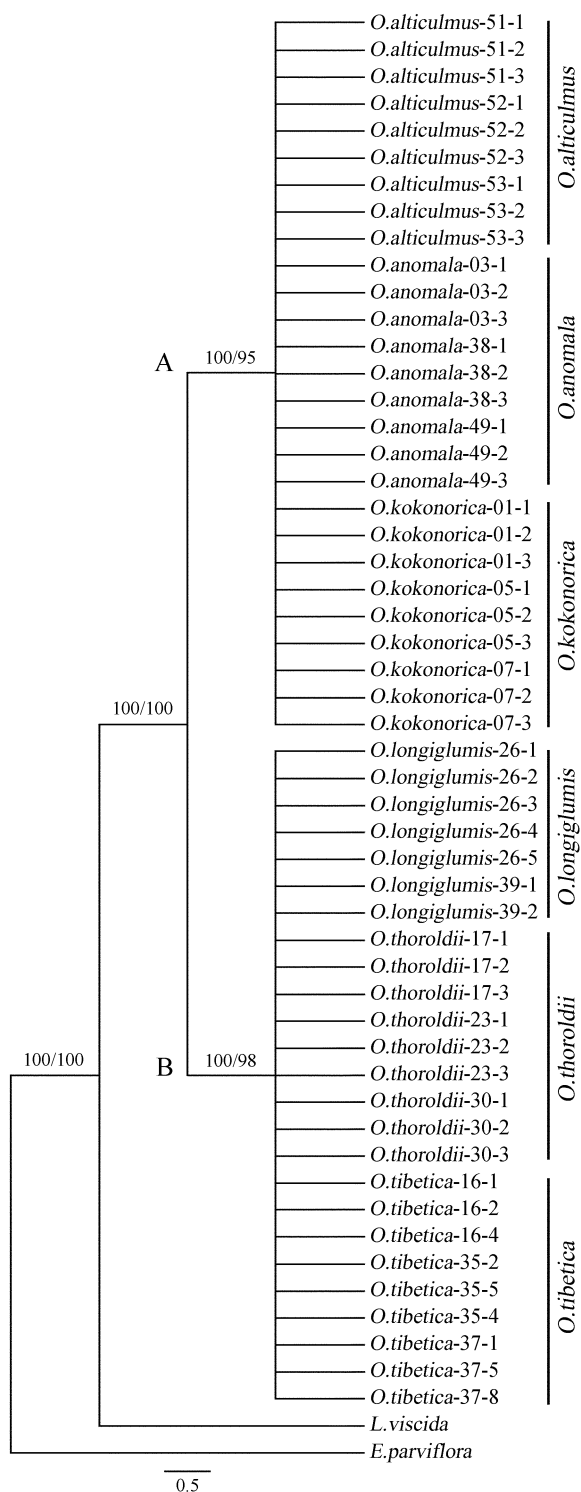


图2 基于 ITS 序列数据构建的最大简约树和 Bayesian 50% 多数规则一致性树。分支上数字分别代表最简约树 (MP) 的自展支持率和 Bayesian 后验概率

Fig. 2 The most parsimonious tree based and fifty percent of Bayesian majority rule consensus tree based on ITS sequences.

Numbers above the branches indicate bootstrap support and the Bayesian posterior probabilities respectively

并给出重复 1 000 次各分支的自展支持率 *BV* (bootstrap value) 值和贝叶斯系统树 (Bayesian inference, BI) 的后验概率 *PP* 值。比较简约法和贝叶斯法的分析结果,发现两种方法构建的系统发育关系极为吻合,只是支持率略有不同 (图 2); 所研究的固沙草属 6 种 18 居群 54 个体分为两个分支,即:一个分支 (A) 是由高秆固沙草 (*Oryzopsis alticulmus*)、鸡爪草 (*O. anomala*) 和青海固沙草 (*O. kokonorica*) 3 个种所测个体构成,并在两种方法中得到较高支持的 *BV* 值和 *PP* 值,分别为 100% 和 95%; 另一分支 (B) 是由西藏固沙草 (*O. tibeticus*)、固沙草 (*O. thoroldii*) 和长颖固沙草 (*O. longiglumis*) 3 个种所测个体组成, *BV* 值和 *PP* 值分别高达 100% 和 85%。从 A 支中,3 个物种 ITS 序列完全相同; 同样,在 B 支中,西藏固沙草、固沙草和长颖固沙草 3 个物种的 ITS 序列也完全一致。两支之间 ITS 有 16 个稳定的突变差异。每一支的 3 个物种以及所有 6 个物种,在以前的分类研究中,都是以圆锥花序形态、小穗长度以及小花数目、外稃与内稃的相对长度以及被毛状况作为种间区别。实际上,我们在野外考察中发现,这些性状即使在同一居群中都存在相当大的变异。因此,我们对 6 个物种初步的分子条形码界定表明,它们可能只分属于两个种,并且这两个种之间的区别可能也不是上述所列性状。当然,这一结论还需要从居群水平上利用多个形态性状进行统计分析,才能说明上述性状是否是种内、居群内变异,找到区分两个遗传分支的形态性状标记 (Rieserberg 等, 2006)。此外,四川北部、西部和西藏东部的部分居群形态上似乎介于固沙草、鸡爪草和西藏固沙草之间,可能是这两个遗传分支的杂交后代 (即可能是杂交带,也有可能形成了一个独立的物种),也有可能代表了从其中一支分化而来的未命名的新物种。

4 种质资源收集和保存对未来研究和利用的意义

通过我们对固沙草属植物近 5 年的考察,我们发现该属植物在青藏高原分布广,形态变异大; 这些系统的居群水平材料收集对解决该属植物的分类学和物种形成问题提供了重要基础。在

此基础上,将来能够开展和需要完成的工作包括:(1)统计分析居群形态性状的变异,对界定已命名6个物种的形态性状是否存在间断,作统计和检验分析;对四川北部、西部和西藏东部的固沙草属居群进行深入的形态性状研究,确定它们的分类学地位;除这些宏观形态性状的居群水平的统计分析之外,还可以开展其他微观性状的调查和研究,如叶表皮性状(气孔和表皮细胞形状等)和染色体性状(染色体数目、核型等),并将这些性状和宏观形态性状进行相关性分析,确定该属的物种界定,即该属究竟有多少物种,也可以帮助确认物种之间的系统发育关系;(2)由于有多个居群材料,正如我们初步开展的利用ITS进行物种界定一样,进而可以利用所有居群代表个体以及更多DNA片段的测序,比较DNA条形码序列变异与形态性状变异与间断之间的相关性,从而确认该属的物种界限和物种数量,同时也可以利用这些序列建立物种之间的系统发育关系;(3)在物种种类和系统发育关系清楚的前提下,进而可利用这些居群材料运用多种分子标记(如SSR,多套核基因座位序列变异等)的群体遗传学数据进行物种形成机制的探讨,如:该属中的姊妹种什么时候分化,高原隆升以及第四纪气候变化与它们的分化是否相关?物种分化过程中是否有基因流?是否存在杂交成种以及其它物种形成方式(如多倍化)?物种形成之后,是否存在快速的扩张等进化问题。

这些分类学和进化问题的深入研究不仅有助于我们广泛收集种质资源的永久保存和管理,更是有助于开发和利用这些固沙草属种质资源。首先,通过分类和进化研究获得的特殊遗传资源(如多倍化居群或物种,以及种间杂交带或杂交物种),可进一步研究其优于其它物种或者居群的适应能力,从而可直接进行引种、扩繁,从而利用自然界历史上该属进化导致的优异种质资源;其次,可通过人工种植不同的物种,然后利用杂交、组织培养等新方法,获得新品种,广泛推广;最后,利用分子生物学(如基因组学比较等)、遗传学等方法,研究和提取固沙草属的优良抗性基因,再利用转基因技术将它们转入其它禾本科牧草和农作物(如小麦)中,培育抗

逆新品种。总之,通过长时间全面的考察,我们已经收集了固沙草属完整的种质资源,不仅为永久保存、而且也为今后研究和利用固沙草属种质资源提供了基本保证,并为此提供了一个新起点。

〔参 考 文 献〕

- 耿以礼, 1959. 中国主要植物图说—禾本科 [M]. 北京: 科学出版社, 283—286
- 杨锡麟, 1990. 固沙草属 [A]. 见: 陈守良, 中国植物志 第10卷 [M]. 北京: 科学出版社, 39—41
- Bor NL, 1960. *The Grasses of Burma, Ceylon, India and Pakistan* [M]. St. Albans: Campfield Press, 519—520
- Cai LB (蔡联炳), 2004. Two new recorded species of *Orinus* from Qinghai Province [J]. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究), **24** (4): 394—395
- Cai LB (蔡联炳), Zhang Y (张燕), Zhang TL (张同林), 2004. Relationships among genera of *Tridentinae* from China based on some leaf epidermal characteristics [J]. *Acta Botanica Boreo-Occident Sinica* (西北植物学报), **24** (9): 1691—1696
- Chen SL, Sylvia M. Philips, 2006. *Orinus* [A]. In: Wu ZY, Raven PH, Hong DY, *Flora of China* [M]. Beijing: Science Press and St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, **22**: 464—465
- China Plant BOL Group, 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **108**: 19641—19646
- Hitchcock AS, 1933. New grasses from Kashmir [J]. *Journal of Washington Academy of Sciences*, **23**: 134—136
- Keng PC (耿伯介), Liou L (刘亮), 1960. A study on the tribe *Eragrostideae* and its two genera new to China [J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学报), **9** (1): 48—75
- Li DZ, Liu JQ, Chen ZD *et al.*, 2011. Plant DNA barcoding in China [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **49**: 165—283
- Rieseberg LH, Wood TE, Baack EJ, 2006. The nature of plant species [J]. *Nature*, **440**: 524—527
- Su X, Cai LB, 2009. *Orinus longiglumis* (Poaceae: chloridoideae), a new species from Xizang (Tibet), China [J]. *Annales Botanici Fennici*, **46** (2): 143—147
- Tzvelev NN, 1968. *Planta Asiae Centralium* Vol. 4 [M]. Aedibus: Nauka, 112—113
- Zhang TL, Cai LB, 2008. A new species of *Orinus* (Poaceae) from Qinghai, China [J]. *Novon*, **18** (2): 273—278
- Zhao NX (赵南先), Li MF (李名飞), 1994. New taxa and new recording species of Gramineae from Tibet [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **16** (3): 228—230